动 物 学 研 究 1995, 16 (2): 146—152 CN 53—1040/Q ISSN 0254—5853
Zoological Research

鹿属动物陈旧皮张标本的DNA提取及PCR扩增*

兰 宏 王 文 施立明
(中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放研究实验室 昆明 650223)

摘要 本实验用改进的方法从保存于标本馆的动物皮张标本中提取DNA，所得DNA片段的分子量从100 bp到1 kb以上。利用线粒体DNA细胞色素b通用引物和PCR技术，从小麂、印度麂、贡山麂、费氏麂、黑麂DNA中扩增出307 bp的细胞色素b特异片段(加上两端引物后长度为364 bp)。用28种限制性内切酶对从新鲜血样和从陈旧皮张标本中所得扩增片段进行酶切分析，发现只有4个酶(*Dra*Ⅰ、*Xba*Ⅰ、*Hae*Ⅲ、*Hpa*Ⅱ)在这个片段上有切点，其中*Hae*Ⅲ和*Hap*Ⅱ的识别位点在各种麂中有所不同。

关键词 麂，皮张标本，PCR扩增 DNA，提取，聚合酶链反应

分子生物学向分类学、进化生物学、古生物学等学科发展渗透，通过分析不同物种的DNA分子的结构异同来探讨物种的起源分化，已成为现代比较生物学的一个发展趋势。当前，人们不仅可以从现生动物中提取DNA进行分子进化研究，甚至可以从博物馆中保存的陈旧标本、木乃伊、毛发、包埋化石中提取DNA进行分析(Higuchi等，1984，1987；Paabo等，1988，1989)。随着能够特异扩增DNA片段的聚合酶链式反应(PCR)(Saiki等，1988)技术的广泛应用，上述研究已成为分子进化研究的一个新热点。遗憾的是，从陈旧标本中提取到的DNA分子量一般都比较小，因而可以从中扩增出的特异片段的分子量也比较小，有时难以满足分子进化研究的需要。

麂属(*Muntiacus*)是分布于中国和东南亚的一类中小型鹿科(Cervidae)动物。现存的麂类，一般认为有以下几种：印度麂(*M. muntjak*) (2n＝6♀，7♂)，小麂(*M. reevesi*) (2n＝46)，黑麂(*M. crinifrons*) (2n＝8♀，9♂)，费氏麂(*M. feae*) (2n＝14♀，15♂)，还有分类位置未取得一致意见的罗氏麂(*M. rooseveltorum*) (2n＝6♀) (Ellerman等，1951)，以及1988年在云南省高黎贡山地区发现的麂属新种——贡山麂(*M. gongshanensis*) (2n＝8♀，9♂)(马世来等，1990)。

麂属动物的起源和进化是一个令人迷惑而又饶有兴趣的研究课题，其系统发育关系仍有待深入研究，该属中甚至可能还有新种未为人们所发现。麂属动物在细胞遗传学研究中具有特别重要的意义，有的种类由于数量稀少而具有较高的保护价值。然而，由于该属中

* 中国科学院"八五"重点课题和1992年国际野生生物保护学会中国西南地区青年野外考察基金资助课题
本文1994年6月20日收到，同年8月16日修回

有些物种在外表上很相似，不易区别，因而给物种鉴定带来很多困难。昆明动物研究所标本馆至今仍保存着一些皮张标本，既无法确定它们的种类、也没有足够证据将其鉴定为新种。物种鉴定的困难已影响到该属动物的其他形态学研究。例如，费氏麂的外形与贡山麂和黑麂非常接近(马世来等、1990)，在野外不易区分。费氏麂主要分布在泰国。过去有人认为中国云南西部也有费氏麂的分布、但自从在云南西部发现麂属动物的新种——贡山麂后、人们先前认为分布在云南西部的费氏麂可能实际上是贡山麂。目前尚无法肯定费氏麂在中国境内的存在。如果能从分子水平上建立一套简单适用的遗传标记，来区分麂属各个物种，分析形态上难以鉴定的标本，则可望解决上述形态学研究中的诸多疑点。

作为此项研究的第一步工作、本实验用改进的方法从保存于标本馆中的动物干皮标本中提取 DNA，得到的 DNA 片段的分子量范围从 100 bp 到 1 kb 以上。利用线粒体 DNA(mtDNA)细胞色素 b(cyt b)通用引物(Iwirn 等，1991)，在总共 23 份提取的 DNA 样品中、共有 15 份样品扩增出特异的 307 bp 片段(加上两端引物后的长度为 364 bp)。我们用限制性内切酶对这些扩增片段进行分析、希望通过各种麂限制性类型的不同来建立遗传标记。

1　材料与方法

1.1　材料

所有用于 DNA 提取的皮张标本均取自中国科学院昆明动物研究所标本馆、数量 23 份。动物种类包括印度麂(*Muntiacus muntjak*)、小麂(*M. reevesi*)、黑麂(*M. crinifrons*)、贡山麂(*M. gongshanensis*)和费氏麂(*M. feae*)，每只动物从耳朵处或其他未剔净肌肉处取 0.5 g 材料进行 DNA 提取和 PCR 扩增。标本保存年代最短者 4 年，最长者 34 年。另外、用于细胞总 DNA 提取的各种麂的组织或培养细胞均来自中国科学院昆明动物研究所野生动物细胞库。

1.2　方法

1.2.1　DNA 提取　参考标准的 DNA 提取方法(Sambrook 等，1989)。对于皮张标本，在提取前作以下预处理：①将标本置于 eppendorf 管中，用 1 ml 浸泡液在 4℃浸泡标本过夜。浸泡液：10 mmol／L Tris-HCl，0.2 mol／L EDTA，50 mmol／L NaCl，pH8.0；②倾弃浸泡液，将泡软的标本用剪刀剪成 1 mm^3 以下的碎片；③用 1 ml 含有 0.1% 胶原酶和 1%胰蛋白酶的 PBS 液在 37℃处理标本 4 h；④3000 r／min 离心 10 min，倾弃上清液。加入 1 ml 含有 1%SDS 和 100 μg／ml 蛋白酶 K 的 STE 液，56℃处理 5 h 后，再加入 100 μg 蛋白酶 K，转移到 37℃温箱中继续处理 48—72 h；⑤10000 r／min 离心 10 min，取上清液，按标准方法进行 DNA 提取。

为防止提取过程中污染微量的外源 DNA 分子造成 PCR 的结果错误，我们设立了一个阴性对照，该对照用滤纸片代替皮张，提取方法与样品完全相同。

1.2.2　PCR 扩增　PCR 扩增所用引物由复旦大学遗传研究所合成，部分引物由张亚平博士惠赠。引物为 mtDNA cyt-b 通用引物中的 L14841 和 H15149，该引物特异地扩增哺乳动物线粒体 DNA 基因组 cyt-b 基因中一个长度为 307 bp 片段，引物序列为：

L14841　5′-AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3′

H15149　5′-AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3′

PCR 扩增的试剂盒购自华美生物公司，PCR 仪为北京新技术应用研究所的 1109 型微电脑自动基因扩增仪。反应系统体积为 25 μl，内含 10 mM Tris-HCl(pH8.9)，50 mM KCl，1.5 mM $MgCl_2$，0.001%明胶，200 μM dNTPs，5 μM 引物，1 μgDNA 样品，2 单位 Taq DNA 聚合酶。每个循环过程为变性：93℃，30 s；复性：55℃，60 s；延伸：72℃，100 s。共进行 40 个循环。反应前在 93℃预变性 3 min，40 个循环结束后在 72℃延伸 5 min。

1.2.3 限制性内切酶消化　酶解总体积为 20 μl，内含 2μl 的酶解缓冲液，0.1—0.5 μg 的样品 DNA，3—5 单位的限制性内切酶。37℃消化 4 h 左右。加入 1／5 体积的载样缓冲液(50%甘油，0.1 M EDTA，0.01%溴酚蓝，pH8.0)终止反应。

1.2.4 琼脂糖凝胶电泳　配制 1.5%的琼脂糖平板凝胶(30cm × 15cm × 0.7cm)，用 30V／40cm 电压室温下电泳 16h。凝胶内含有 0.5 μg／ml 的溴化乙锭(EB)，紫外灯下观察、拍照。

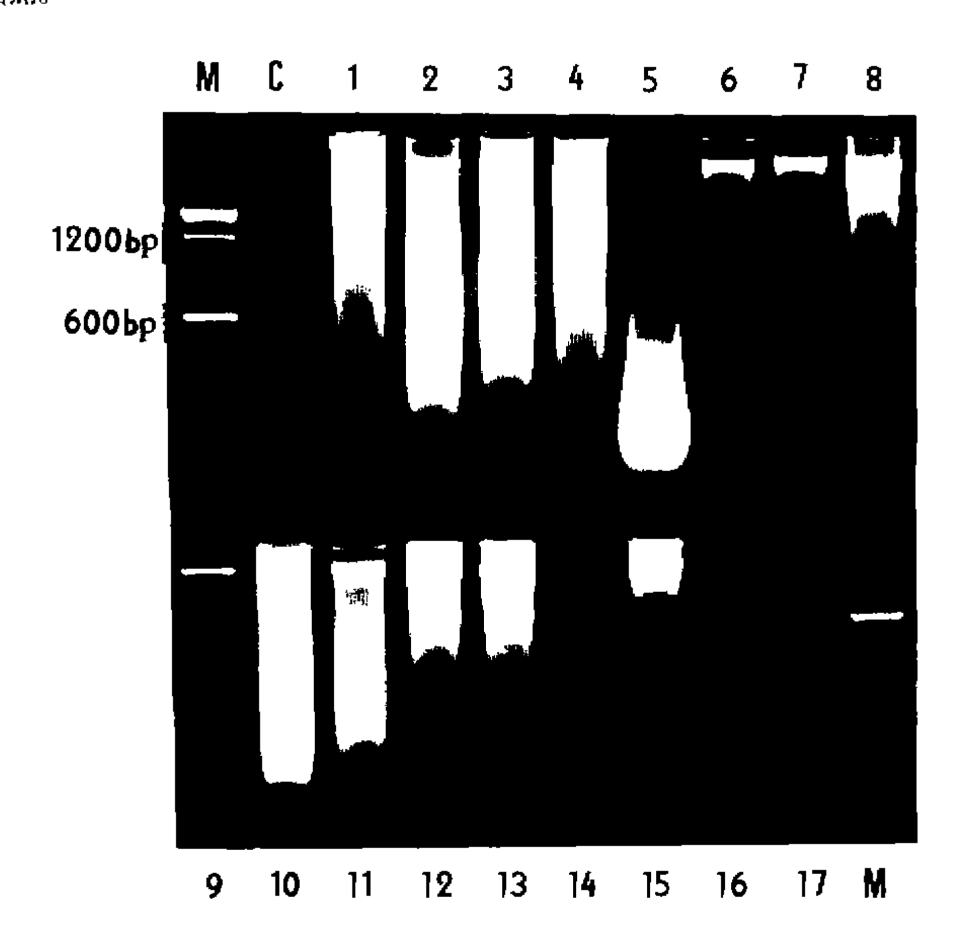


图 1　17 份麂皮张标本中抽提的 DNA 电泳图谱

Fig. 1　The agarose electrophoresis pattern of DNAs from 17 specimens of muntjac

M 为 100 bp 梯度的分子量标记，其中 600 bp 和 1200 bp 带已标出；C 为 DNA 提取对照。

M is the 100 bp ladder as molecular size marker (600 bp and 1200 bp indicated), and C is the control extraction.

2 结果

从陈旧标本中提取的 DNA 的电泳图谱如图 1 所示，DNA 碎片的分子量达到 1 kb 以上。从 0.5 g 皮张标本中，用本方法大约可以提取到 0—100 μgDNA 分子。

PCR 扩增结果见图 2。我们可以看到，目标 DNA 的扩增片段大小约为 360 bp(实际应是 364 bp)，空白对照和阴性对照均无扩增片段，表明 DNA 提取和扩增过程未受到外源 DNA 分子的污染。虽然反应体系中所含模板 DNA 分子的量大体相等，但由于不同标本所提取到的 DNA 分子大小很不相同，反应体系中实际所含的模板拷贝数有很大差异，因此扩增带的明暗程度颇不一致。

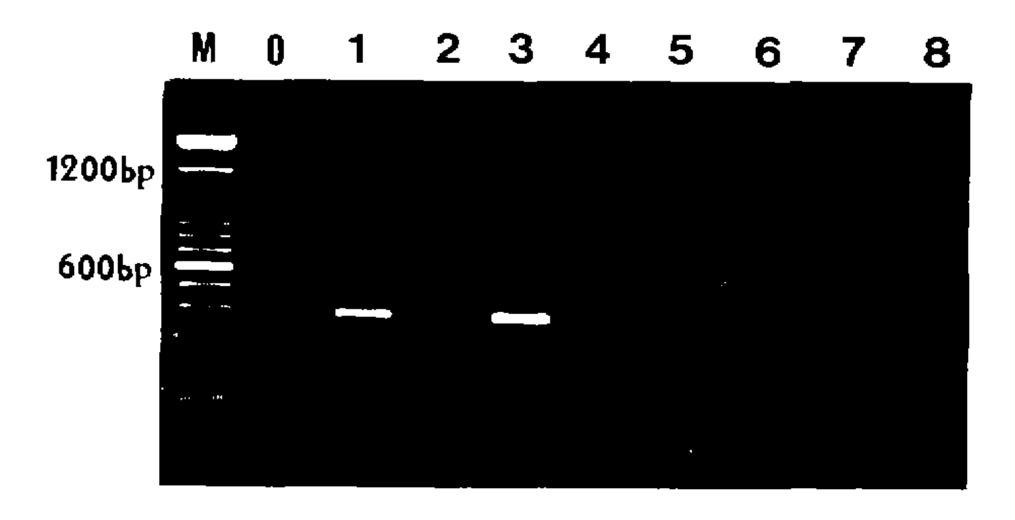


图 2　鹿皮张标本的通用引物 PCR 扩增产物电泳图谱

Fig. 2　The agarose electrophoresis pattern of universal primer-directed PCR products from DNA of fur specimens of muntjac

M 为 100bp 梯度的分子量标记，其中 600 bp 和 1200 bp 带已标出；0 为空白对照，5 为阴性对照。

M is the 100 bp ladder as molecular size marker (600 bp and 1200 bp indicated), and 0 is the negative control amplification, and 5 is the control amplification

为了进一步证明我们扩增的片段确实是鹿 cyt-b 基因的一部分，我们需要先从各种鹿的血液中提取 DNA，进行同样的 PCR 扩增，然后用限制性内切酶来处理扩增产物，建立遗传标记，并用此标记来检验我们从皮张标本中提取、扩增的 DNA 片断。我们共使用了 28 种限制性内切酶去寻找扩增片段上可能的酶切位点，其中 9 种酶识别四碱基序列：*Alu* Ⅰ，*Hae*Ⅲ，*Hinf* Ⅰ，*Hpa*Ⅱ，*Msp*Ⅰ，*Sau*3AⅠ，*Sin*Ⅰ，*Sty*Ⅰ，*Taq*Ⅰ；19 种酶识别六碱基序列：*Apa*Ⅰ，*Ava*Ⅰ，*Bam*HⅠ，*Bcl*Ⅰ，*Bgl*Ⅰ，*Bgl*Ⅱ，*Cla*Ⅰ，*Dra*Ⅰ，*Eco*RⅠ，*Eco*RⅤ，*Hind*Ⅲ，*Hpa*Ⅰ，*Kpn*Ⅰ，*Pst*Ⅰ，*Pvu*Ⅱ，*Sac*Ⅰ，*Sca*Ⅰ，*Xho*Ⅰ，*Xba*Ⅰ，结果只有 *Hae*Ⅲ，*Hpa*Ⅰ，*Dra*Ⅰ，*Xba*Ⅰ 4 个酶在鹿的扩增片段上有切点。各种鹿的扩增片段经这 4 种酶处理后产生的限制性态型如表 1 所示。作为例子，*Hpa*Ⅱ酶切电泳图谱见图 3。

表1　各种麂的扩增片段经4种酶处理后产生的限制性态型

Tab. 1　Restriction patterns of amplified muntjac mtDNA fragments

限制酶	多态型	识别序列	切点数	限制性片段分子量(bp)
*Hae*Ⅲ	A	CCGG	1	300、—
	B		0	360
	C		2	130、120、110
*Hpa*Ⅱ	A	GGCC	1	300、—
	B		0	360
	C		2	130、120、110
*Dra*Ⅰ		TTTAAA	1	250、110
*Xba*Ⅰ		TCTAGA	1	300、—

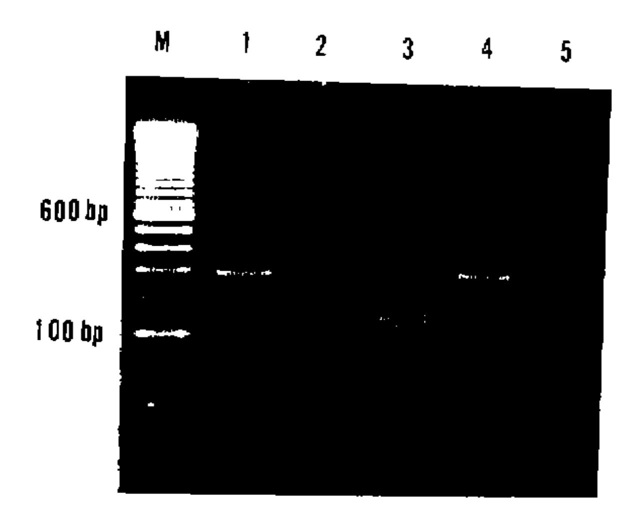


图3　麂PCR扩增产物的*Hpa*Ⅱ酶解电泳图谱

Fig. 3　The *Hpa*Ⅱ digestion patterns of PCR products from muntjacs

100 bp和600 bp带已标出。第1—5号样品分别是贡山麂、费氏麂、印度麂、黑麂和小麂。

M is the 100 bp ladder as molecular size marker (100 bp and 600 bp indicated), and Lane 1 through 5 are from *M. gongshanensis*, *M. feae*, *M. muntjak*, *M. crinifrons* and *M. reevesi*, respectively.

从表1可以看到，只有*Hae*Ⅲ和*Hpa*Ⅱ的限制性态型在各种麂中有所不同。贡山麂和黑麂的限制性态型为*Hae*Ⅲ-A，*Hpa*Ⅱ-A，费氏麂的限制性态型为*Hae*Ⅲ-B、*Hpa*Ⅱ-B。而小麂和印度麂的限制性态型为*Hae*Ⅲ-c，*Hpa*Ⅱ-c，由此我们可以把5种麂分为三组，一组为贡山麂、黑麂；另一组为费氏麂；第三组为小麂和印度麂。但我们未能找到各种麂特有的遗传标记。

根据我们从贡山麂血液中提取DNA、PCR扩增建立的遗传标记，我们已经知道贡山麂cyt-b的364bp片段中有1个*Hpa*Ⅱ识别位点，该酶可将这一片段切成1条300 bp左右的片段(另一条60bp的片段在电泳胶上不易看到)。用*Hpa*Ⅱ处理我们从贡山麂皮张标本中扩增出的片段，也产生1条300 bp的片段，从而证明这一片段确实是贡山麂的cyt-b基因片段。

3 讨论

3.1 皮张标本的DNA提取和PCR扩增

从陈旧的标本中提取DNA分子进行分子生物学分析，是当前分子生物学和进化生物学、古生物学相结合进行研究的一个热点。一般认为，动物死亡后，细胞内的酶系统由于失去调控系统的控制，开始对自身进行降解，细胞内的DNA将被大量降解，因此从陈旧标本中提取到的DNA分子量都很小。死亡一定时间后，酶逐渐失活，细胞也不断失去水分，这种自身降解作用将逐渐减弱并趋于停止。Paabo(1989)认为从动物死亡到标本完全干燥的时间的长短，是该标本能够保留多大DNA分子最关键的因素，他曾经证明从几千年前的标本中提取的DNA分子的平均大小和从几年前的标本中提取到的分子大小完全没有差异；甚至从木乃伊中提取出的DNA分子还比较大些。他认为木乃伊在死亡不久就立即进行了处理，阻抑了降解过程，因而DNA分子反而保存得好一些。我们的结果也表明，能否扩增出307 bp片段与提取到的DNA分子量有关，但与标本保存的年代长短没有相关性。

我们推测，前人从陈旧标本中提取到DNA片段不够大，不是因为该标本中没有较大的DNA分子，而是因为这些分子在提取过程中由于处理不当被DNA酶降解。降解大约主要发生在标本被浸泡软化的时候，因此，我们采用含高浓度EDTA的浸泡液，抑制DNA酶的活性，有效地防止了DNA降解。另外，胶原酶和胰蛋白酶宜采用高浓度，短时间，尽量减少DNA酶作用的机会。

显然，扩增得到的DNA片段的特异性还有待于DNA序列分析的确证。目前有关的工作正在进行中。

3.2 麂属动物的遗传标记

一个良好的遗传标记必须满足下列条件：

①稳定性：该标记不受性别、年龄、生活状态等可变因素的影响；

②特异性：为某种动物所特有，至少需要鉴别的两种动物必须具有不同的标记；

③代表性：一个特定的标记在特定的动物中变异性必须很小，即绝大多数同种动物都要带有这个标记。为了防止个体差异导致错误的判断，有时需要建立两个或多个遗传标记，以保证结果的可靠性。

线粒体DNA分子结构简单，无组织和生长状态特异性，不发生重组，个体差异相对较小而物种间差异较大，因此是建立物种间遗传标记的良好工具。

虽然用限制性内切酶位点多态性来建立遗传标记的思路是正确的，但由于扩增片段只有360 bp左右，很多酶在其上没有切点，一个个酶的筛选不仅费时费力，而且需要耗费大量昂贵的限制性内切酶。一个可行的修改办法是，先测定某种麂的扩增片段的序列，有针对性地寻找在这一片段上具有识别位点的限制性内切酶，然后再用这些酶处理各种麂的扩增片段，寻找多态性，建立遗传标记。

致谢 王应祥研究员提供皮张标本，张亚平博士惠赠部分引物、朱春玲同志提供有效的技术协助，在此一并致谢。

参考文献

马世来，王应祥，徐龙辉，1986 麂属的分类及其系统发育研究. 兽类学报，6: 191—207.

马世来，王应祥，施立明，1990 麂属(*Muntiacus*)一新种 动物学研究，11(1): 47—52

Ellerman J R, Morrison-Scott T C S. 1951 Checklist of palearctic and Indian mammals. England: Tonbridge, Kent.

Higuchi R G, Bowmam B, Freiberger M *et al*, 1984. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 312: 282-284

Higuchi R G, Wrischnik L A, Oakes E *et al*, 1987. Mitochondrial DNA of the extinct quagga: relatedness and extent of postmortem change. *J. Mol Evol* 25: 283-287.

Irwin D M, Kocher T D, Wilson A C, 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J Mol. Evol.* 32: 128-144

Paabo S, Gifford J A, Wilson A C, 1988. Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nuc Acid Res.* 16: 7775-7787.

Paabo S. 1989. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzyme amplification. *PNAS* (USA) 86: 1939-1943

Saiki R K, Gelfand D H, Stoffel S *et al*, 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymorease. *Science*, 239: 487-491.

Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 1989. Molecular cloning (2ed ed), Cold Spring Harbor.

PCR ANALYSIS OF DNA FROM FUR SPECIMENS OF MUNTJACS (*Muntiacus*)

Lan Hong Wang Wen Shi Liming

(*Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming* 650223)

Abstract

The DNAs were extracted from both fresh sample and fur specimens of the Indian muntjac (*M. muntjak*), the Chinese muntjac (*M. reevesi*), the black muntjac (*M. crinifrons*), Fea's muntjac (*M. feae*), and the Gongshan muntjac (*M. gongshanensis*). For the fur specimens, DNAs of over 1.0 kilobase pair (kb) were obtained. Polymerase Chain Reactions (PCR) were performed for these DNAs using a pair of universal primers localized in cytochrome b gene of animal mitochondrial DNA. Fragments of about 360 base pair (bp) in size were detected by 1.5% agarose gel electrophoresis. We used 28 restriction endonucleases to digest the amplified fragments and found some polymorphic sites among mtDNA of muntjacs.

Key words Muntjac, Fur specimens, PCR (Polymerase Chain Reaction)